



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek



MEHANIZMI OČUVANJA TOČNOSTI BIOSINTEZE PROTEINA NA RIBOSOMU

MECHANISMS OF MAINTAINING ACCURACY OF PROTEIN BIOSYNTHESIS ON THE RIBOSOME

Seminarski rad

STUDENTICA: Matilda Maleš

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

MENTORICA: doc.dr.sc. Ita Gruić-Sovulj

Zagreb, 2010.

Sadržaj:

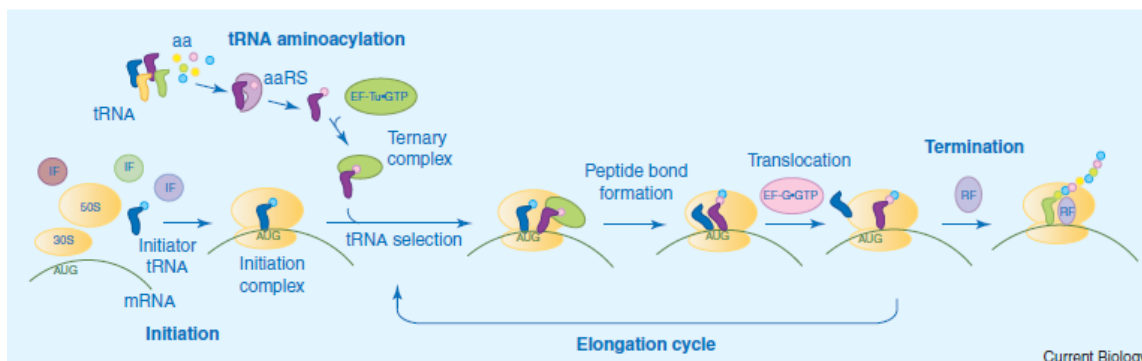
| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 3 |
| 2. KINETIČKA PROVJERA | 4 |
| 3. KINETIČKI PUT VEZANJA NA A MJESTO | 6 |
| 4. KINETIČKI MEHANIZMI | 9 |
| 5. INDUCIRANO PRISTAJANJE | 9 |
| 6. STRUKTURNI ASPEKTI | 10 |
| 7. ULOGA tRNA | 12 |
| 8. RETROSPEKTIVNA KONTROLA..... | 14 |
| 9. ANTIBIOTICI I MUTACIJE..... | 15 |
| 10. IONSKI UVJETI..... | 17 |
| 11. LITERATURA..... | 18 |
| 12. SAŽETAK..... | 20 |
| 13. SUMMARY | 21 |

1. UVOD

Protok genetičke informacije od DNA do proteina predstavlja osnovu života na staničnoj razini. Osnovni procesi preko kojih se odvija prijenos informacija su replikacija i transkripcija DNA te translacija messenger RNA (mRNA), a rezultat su evolucije koja je trajala milijunima godina. Ono što čini život mogućim su točnost i brzina upravo tih procesa. Replikacija i transkripcija zasnivaju se na komplementarnosti novih nukleotida i postojećeg DNA kalupa, dok se translacija bazira na komplementarnosti antikodona transfer RNA (tRNA) i kodona messenger RNA. Stanična mašinerija nadgleda sazrijevanje tRNA i mRNA, kao i identitet aminokiselina koje se vežu na tRNA. Preciznost tijekom prijenosa genetičke informacije dodatno je regulirana tijekom odabira aminoaciliranih tRNA (aa-tRNA) na ribosomu te prilikom sparivanja tRNA i mRNA.

Pod translacijom podrazumijevamo biosintezu proteina na ribosomu, koja uključuje brzu polimerizaciju aminokiselina. Ribosom bakterija sastoji se od dvije različite podjedinice, 30S i 50S, koje sudjeluju u prepoznavanju tRNA, elongaciji polipeptidnog lanca i njegovom otpuštanju s ribosoma prilikom završetka sinteze. Tijekom translacije, podjedinice se sastavljaju u jedinstveni 70S ribosom, koji sadrži tri mjesta na koja se veže tRNA: A (aminoacilno mjesto), P (peptidilno mjesto) i E (izlazno mjesto). Da bi aminokiselina došla na ribosom, najprije je potrebno da se esterskom vezom veže s molekulom tRNA. Ta se reakcija odvija u dva koraka uz utrošak molekule ATP-a, a kataliziraju ju je enzimi aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS). Aminoacilirana tRNA prenosi se do ribosoma u trojnom kompleksu, koji osim nje sadrži elongacijski faktor Tu (EF-Tu) i guanozin-trifosfat (GTP). U stanici postoji mnogo aminoaciliranih tRNA koje su kompleksirane s EF-Tu, tako da je jedna od zadaća ribosoma da u svakom krugu elongacijskog ciklusa odabere ispravan kompleks. Ispravnim kompleksom smatramo onaj koji sadrži tRNA s antikodonom komplementarnim kodonu mRNA, koji je smješten u A mjestu dekodirajućeg centra ribosoma. Unutar dekodirajućeg centra dolazi do prepoznavanja ispravne aminoacilirane tRNA. Smješten je na 30S podjedinici, udaljen $\sim 70\text{\AA}$ od mjesta P gdje se odvija polimerizacija, a koje je smješteno na 50S podjedinici. Nakon što se polipeptidni lanac produži za jednu aminokiselinu slijedi translokacija, koju katalizira elongacijski faktor G (EF-G). On koristi energiju hidrolize GTP-a kako bi pospješio pomicanje peptidilne-tRNA u P mjesto te deacilirane tRNA u E mjesto. Elongacija polipeptidnog lanca završava kada u A mjesto dođe stop kodon mRNA, kojeg

onda prepoznaju faktori otpuštanja (RF1 i RF2), što dovodi do hidrolize peptidil-tRNA i otpuštanja polipeptidnog lanca.



Slika 1. Pregled translacije i njenih individualnih koraka. (preuzeto iz: Cochella i Green 2005)

Intuitivno vjerujemo da je mehanizam translacije tako podešen da se odvija bez ugrađivanja pogrešnih aminokiselina u polipeptidni lanac. Međutim, situacija u uvjetima *in vivo* daleko je od idealne. Eksperimenti u kojima su mjerene učestalosti ugradnje pogrešnih aminokiselina kod bakterija pokazali su da se one kreću od 6×10^{-4} do 5×10^{-3} . Učestalosti pogrešaka kod eukariota kreću se u jednakom rasponu, od 1×10^{-5} kod kvasca do 1×10^{-4} – 1×10^{-3} kod viših eukariota (Rodnina i Wintermeyer 2001). Do pogrešaka tijekom biosinteze proteina može doći zbog lake disocijacije kratkih peptidil-tRNA prije ili tijekom translokacije te ugradnje krivih aminokiselina u rastući polipeptidni lanac zbog pomaka okvira čitanja ili zbog krivog sparivanja kodona i antikodona u A ili P mjestu. S obzirom na sparivanje kodona i antikodona razlikujemo tri vrste aa-tRNA: srodne, približno srodne i nesrodne. Srodne tRNA su one čije su baze antikodona potpuno komplementarne bazama kodona na mRNA. Približno srodne aa-tRNA se sparuju s kodonom na način da je jedan par baza na prvoj ili drugoj poziciji kodon-antikodon kompleksa krivo sparen, dok su kod nesrodnih aa-tRNA krivo sparena dva ili čak sva tri para baza.

2. KINETIČKA PROVJERA

Jedan od glavnih problema razumijevanja biosinteze proteina je otkrivanje načina postizanja tako niske učestalosti pogreške kao što je 1×10^{-4} . U većini kemijskih procesa lako

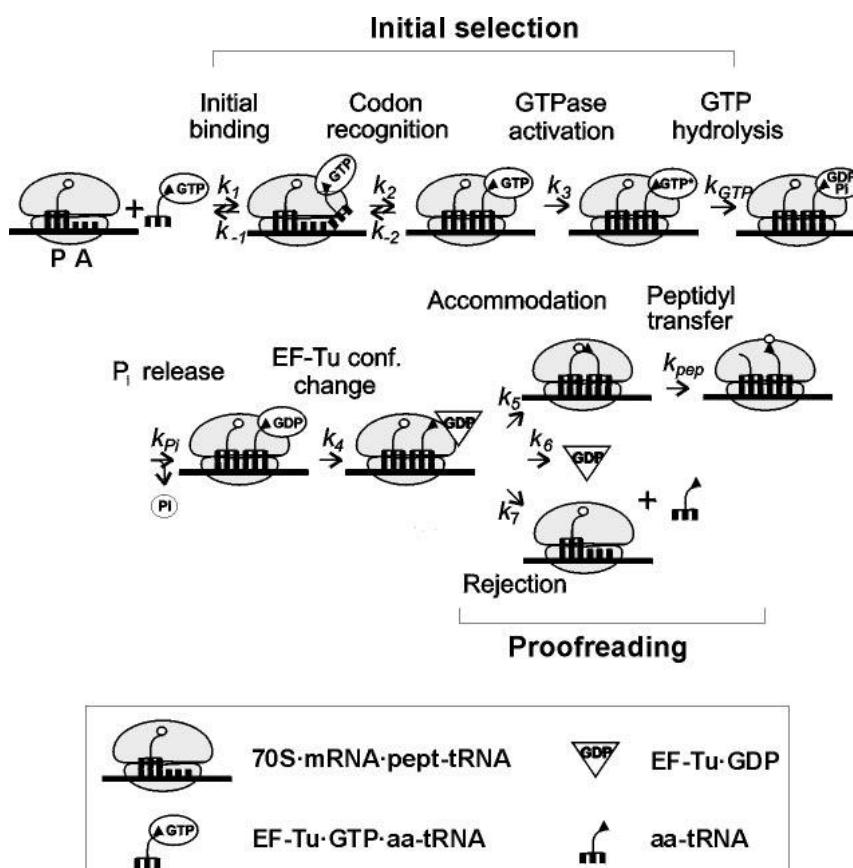
je objasniti zašto je jedna reakcija povoljnija od druge jednostavno se koristeći zakonima termodinamike. Naime, kemijsku reakciju smatramo povoljnijom što je njena slobodna Gibbsova energija (ΔG) negativnija. S obzirom da svaki sustav u prirodi nastoji imati što manju energiju, logično je da je upravo onaj proces koji oslobađa više energije te pritom stvara niže-energetski sustav povoljniji od onog koji oslobađa manje energije. No, kod biosintetskih procesa koji zahtijevaju „čitanje“ određene upute kao što su replikacija, transkripcija i translacija, postizanje točnosti i ugradnja pravilnih nukleotida ne može se objasniti isključivo termodinamičkim pristupom. Naime, slobodna energija prilikom formiranja G·U para razlikuje se od slobodne energije prilikom formiranja pravilno sparenih A·U i G·C parova za samo 2-3 kcal/mol (1cal=4,18 J) (Lehninger 1970). Specifičnost baze U za A kao i G za C daleko je od apsolutne. Minimalna učestalost G·U pogrešaka u jednostavnom trinukleotidu dvostruke zavojnice bila bi oko 1-2%, odnosno jednaka ili veća teorijski očekivanoj učestalosti od $\exp(-\Delta G/RT)$, gdje je ΔG razlika u slobodnoj energiji između formiranja G·U i standardnog para baza (Hopfield 1974).

Hopfield i Ninio su nezavisno predložili alternativni mehanizam za povećanje specifičnosti vezanja aa-tRNA na ribosom: korak kinetičke provjere koji bi uslijedio nakon početnog selektivnog vezanja. Taj korak je moguć zahvaljujući ireverzibilnoj hidrolizi GTP-a koji se nalazi u trojnom kompleksu. Ireverzibilna hidroliza GTP-a odvaja dva neovisna kontakta aa-tRNA i ribosoma. Prema tom mehanizmu, najprije se provjerava razlika u ΔG prilikom inicijalnog vezanja srodnih odnosno približno srodnih i nesrodnih aa-tRNA na ribosom. Nakon hidrolize GTP-a, ponovno se provjerava razlika u ΔG i to za proces asocijacije ribosoma i trojnog kompleksa koji sadrži GDP ili za proces asocijacije aa-tRNA i ribosoma nakon disocijacije EF-Tu. Prve eksperimente koji su provjeravali ispravnost ove hipoteze napravili su Thompson i Stone. Oni su koristili sustav s poli(U)-programiranim ribosomom, te su promatrali njegovo ponašanje prilikom dodatka različitih srodnih i nesrodnih aa-tRNA u prisustvu EF-Tu i GTP-a. Njihovi rezultati su pokazali da nesrodne aa-tRNA ne stimuliraju hidrolizu GTP-a, dok približno srodne aa-tRNA to čine, no poslije tog koraka se ne zadržavaju na ribosomu (Thompson i Stone 1977). Navedeni rezultati su uputili na postojanje koraka kinetičke provjere kojeg su predložili Hopfield i Ninio. Model kinetičke provjere predviđa da usporavanje hidrolize GTP-a rezultira većom točnošću translacije jer se na taj način ribosomu daje više vremena za postizanje ravnoteže pri koraku inicijalnog vezanja aa-tRNA. Eksperimenti Thompsona i Karima su pokazali da analozi GTP-a koji su

slabo hidrolizabilni poput guanozin- γ -tiotrifosfata (GTP- γ S) pospješuju ukupnu točnost translacije (Thompson i Karim 1982).

3. KINETIČKI PUT VEZANJA NA A MJESTO

Vezanje trojnog kompleksa na A mjesto je proces koji se odvija u više koraka. Rodnina i suradnici su u svojim eksperimentima analizirali kompletni kinetički mehanizam vezanja Phe-tRNA^{Phe}:EF-Tu na poli(U)- programirani ribosom kod bakterije *Escherichia coli*. Nekoliko koraka vezanja na A mjesto je direktno promatrano metodom zaustavljenog protoka fluorescencije (eng. *stopped-flow fluorescence*) uz korištenje tRNA obilježene proflavinom, Phe-tRNA^{Phe}(Prf16/17) i fluorescentnog analoga GTP-a, mant-GTP-a. Brzine hidrolize GTP-a određene su metodom gašenja protoka (eng. *quench-flow*) (Rodnina i Wintermeyer 2001).



Slika 1. Kinetička shema vezanja aa-tRNA na A mjesto. Mjerene vrijednosti za konstante brzine nalaze se u Tablici 1. Brzine kemijskih koraka su ograničena brzinama reakcija koje prethode. Naglašene su dvije faze odabira. EF-Tu je različito prikazan u GTP i GDP-vezanoj konformaciji. Skraćenice: 70S, 70S ribosom; pept-tRNA, peptidilna tRNA; P_i, anorganski fosfat. (preuzeto iz: Rodnina i Wintermeyer 2001)

Tablica 1. Osnovne konstante brzine za vezanje srodnih, približno srodnih i nesrodnih aa-tRNA na A mjesto^{a,b} (preuzeto iz: Rodnina i Wintermeyer 2001)

| Step | | Rate constant (s ⁻¹) | | |
|--|----------|----------------------------------|------------------|-----------------|
| | | Cognate | Near-cognate | Noncognate |
| Initial binding | k_1 | 110 ^c | 110 ^c | 60 ^c |
| | k_{-1} | 25 | 25 | 25 |
| Codon recognition | k_2 | 100 | 100 | |
| | k_{-2} | 0.2 | 17 | |
| GTPase activation and GTP hydrolysis ^d | k_3 | 500 | 50 | 0.005 |
| GTP-GDP conf. change of EF-Tu | k_4 | 60 | 70 | |
| Accommodation of aa-tRNA and formation of peptide bond ^d | k_5 | 7 | 0.1 | |
| Dissociation of EF-Tu | k_6 | 3 | 2 | |
| Rejection of aa-tRNA | k_7 | <0.3 | 6 | |

^aPodaci preuzeti iz: Pape i sur. 1999, 1998

^bKinetički koraci i konstante brzina su definirani na Sl.1. Poli(U)-programirani ribosomi su korišteni s trojnim kompleksom Phe-tRNA^{Phe} (srodni), Leu-tRNA^{Leu2} (GAG) (približno srodni), ili poli(A)-programirani ribosomi s Phe-tRNA^{Phe} (nesrodni). Konstante brzina koje utječu na razlikovanje su podebljane.

^cμM⁻¹ s⁻¹

^dGrupirani za analizu jer reakcija koja prethodi ograničava brzinu.

1) Inicijalni korak

Početni korak u interakciji EF-Tu·GTP·aa-tRNA s ribosomom je brz i neovisan o kodon-antikodon interakciji, pri čemu se formira kinetički labilan inicijalni kompleks (Pape i sur. 1998). Vrijednost k_1 je otprilike 10⁸ M⁻¹s⁻¹ (20 °C), što je prilično veliko, u usporedbi s konstantama tipičnih reakcija drugog reda u kojima dolazi do formiranja makromolekularnih kompleksa, koje su rasponu od 10⁵-10⁷ M⁻¹s⁻¹. Konstanta brzine reakcije disocijacije (k_{-1}) je 25-30 s⁻¹ pri 20 °C, te se povećava na 50-70 s⁻¹ pri 37 °C. U odsustvu EF-Tu, nije primijećeno brzo inicijalno vezanje, što upućuje da je ono dominirano interakcijama EF-Tu i ribosoma. Biološki smisao brzog inicijalnog vezanja je omogućavanje ribosomu pregledavanja različitih trojnih kompleksa, te dopuštanje efikasnog odbijanja nesrodnih aa-tRNA već u prvom koraku.

2) Prepoznavanje kodona

Konstanta brzine za prepoznavanje kodona, k_2 , je 100 s⁻¹ i otprilike je ista i za srodne i za približno srodne aa-tRNA. Za nesrodne aa-tRNA, prepoznavanje kodona ne može se dogoditi. Stabilnost kompleksa kodon-antikodon strogo ovisi o komplementarnosti baza.

3) Aktivacija GTP-aze i hidroliza GTP-a

Kompleks EF-Tu·GTP·aa-tRNA vezan na ribosom brzo hidrolizira GTP i to najvećim dijelom ovisi o prepoznavanju kodona. To potvrđuje činjenica da kompleks koji sadrži nesrodnu aa-tRNA jako sporo hidrolizira GTP (10^{-3} - 10^{-2} s⁻¹). Ukoliko srodna aa-tRNA prepozna kodon, GTP se hidrolizira s konstantom brzine reakcije hidrolize od > 500 s⁻¹ (Pape i sur. 1998). U eksperimentima u kojima se koristio fluorescentni analog GTP-a, mant-dGTP, identificiran je korak koji prethodi hidrolizi GTP-a, a ima istu istu ili manju konstantu brzine kao i hidroliza (Pape i sur. 1999, 1998). Taj korak predstavlja konformacijsku promjenu EF-Tu induciranu interakcijom kodona i antikodona, a koja onda pokreće hidrolizu GTP-a. Konformacijska promjena podrazumijeva reorijentaciju katalitičkih grupa u G domeni EF-Tu u položaj optimalan za GTP-aznu aktivnost.

4) i 6) Konformacijska promjena EF-Tu i disocijacija EF-Tu·GDP

Nakon hidrolize GTP-a i otpuštanja anorganskog fosfata (P_i), EF-Tu mijenja konformaciju u onu koja veže GDP. Konstanta brzine te konformacijske promjene, k_4 , iznosi oko 60 s⁻¹ (20 °C) i ne ovisi o tome da li je aa-tRNA srodna ili približno srodna (Pape i sur. 1999, 1998). Brzina tog događaja je dovoljna da ne ograničava brzinu događaja koji slijedi, a to je akomodacija ili disocijacija aa-tRNA. EF-Tu·GDP disocira s ribosoma s konstantom brzine (k_6) od 3 s⁻¹.

5) i 7) Akomodacija, formiranje peptidne veze i disocijacija aa-tRNA

Nakon što disocira s EF-Tu, aa-tRNA se smješta u 50S A mjesto (akomodacija) i tu sudjeluje u stvaranju peptidne veze. Za srodne aa-tRNA, konstanta brzine akomodacije (k_5) je oko 7 s⁻¹. Čim se aa-tRNA smjesti u A mjesto, odvija se reakcija stvaranja peptidne veze katalizirana peptidil transferazom ($k_{pep} > 100$ s⁻¹). Konstanta brzine disocijacije srodne aa-tRNA u ovom slučaju je ispod granica detekcije ($k_7 < 0.3$ s⁻¹) (Pape i sur. 1998). Za razliku od srodne aa-tRNA, približno srodna aa-tRNA, kao na primjer Leu-tRNA^{Leu2}, disocira s ribosoma s konstantom brzine k_7 oko 6 s⁻¹, dok je konstanta brzine za akomodaciju (k_5) takve aa-tRNA 0.1 s⁻¹.

4. KINETIČKI MEHANIZMI

Postoje dvije strategije na ribosomu koje omogućuju razlikovanje srodnih i nesrodnih aa-tRNA tijekom inicijalnog odabira i kinetičke provjere. Trojni kompleks koji sadrži srodnu aa-tRNA, jače je vezan na ribosom od onog koji sadrži približno srodnu ili nesrodnu aa-tRNA (male vrijednosti za k_{-2} i k_7). Ugradnja aminokiselina je brža za srodne nego za približno srodne aa-tRNA zbog dviju konformacijskih promjena koje ograničavaju brzinu: aktivacija GTP-azne aktivnosti EF-Tu (k_3) i akomodacija aa-tRNA (k_5). Ti koraci su puno brži za srodne aa-tRNA, tako da u tom slučaju dolazi do brže hidrolize GTP-a i formiranja peptidne veze.

5. INDUCIRANO PRISTAJANJE

Ribosom ima različite afinitete za različite aa-tRNA. Inducirano pristajanje je mehanizam koji mu omogućava razlikovanje srodnih i nesrodnih trojnih kompleksa, odnosno samih aa-tRNA. Teorija inducirano pristajanja pretpostavlja da:

- a) precizna orijentacija katalitičkih grupa je potrebna za djelovanje enzima;
- b) supstrat može uzrokovati povoljnu konformacijsku promjenu unutar aktivnog mjesta;
- c) promjene u strukturi proteina koje je prouzročilo vezanje supstrata dovest će do pravilnog orijentiranja katalitičkih grupa, koje onda dovode do napredovanja reakcije, dok to isto nije karakteristično za ne-supstrat.

Dokazi za supstrat-inducirane konformacijske promjene pronađeni su kod mnogobrojnih enzima te je ribosom samo još jedan primjer enzima koji koristi mehanizam inducirano pristajanja. Štoviše, bilo koja reakcija na ribosomu, uključujući aktivaciju GTP-azne aktivnosti EF-Tu i stvaranje peptidne veze, zahtijeva precizno smještanje katalitičkih skupina unutar aktivnih mjesta. Smatra se da sa ribosom aktivira GTP-azno djelovanje EF-Tu, a precizno pozicioniranje tRNA u peptidil transferaznom centru je bitno kako bi se reakcija stvaranja nove peptidne veze odvijala dovoljno brzo.

Kristalne strukture 30S podjedinice pokazale su da vezanje supstrata, aa-tRNA, inducira promjene lokalno, u dekodirajućem centru i globalno, djelujući na konformaciju cijele 30S podjedinice. Usporedba kristalnih struktura ribosoma u slučaju kada je A mjesto prazno i kada je unutar njega smještena aa-tRNA, pokazala je da vezanjem trojnog

kompleksa na ribosom dolazi do promjene nekoliko mostova unutar podjedinica. Dakle, moguće je da promjene nastale vezanjem mRNA i tRNA unutar 30S dekodirajućeg centra uzrokuju strukturne promjene koje djeluju i na 50S podjedinicu i katalitičke centre smještene u njoj.

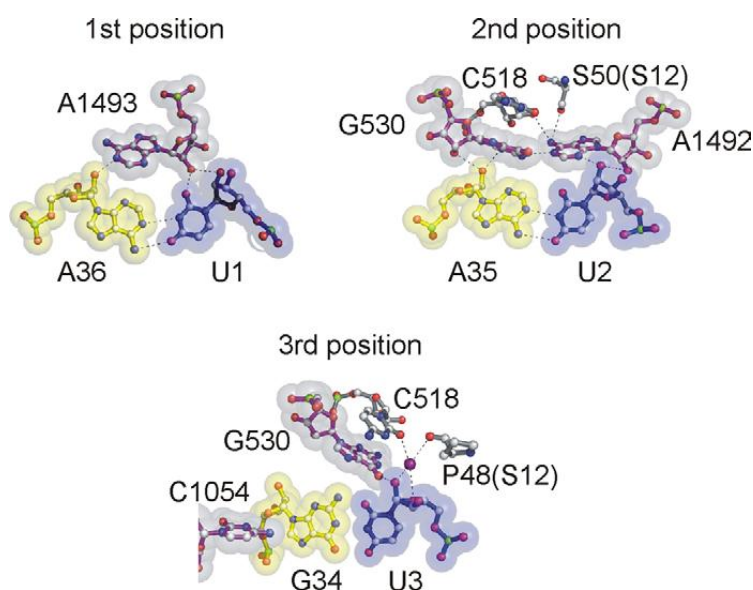
Promjene u strukturi ribosoma koje uzrokuje ispravan supstrat, ne događaju se u slučaju vezanja krivog supstrata. Ove razlike podudaraju se s rezultatima kinetičkih eksperimenata u kojima su se promatrale brzine aktivacije GTP-azne aktivnosti EF-Tu i akomodacije tRNA u A mjestu. Pokazano je da su te reakcije puno brže za ispravne, nego za krive supstrate (Gromadski i Rodnina 2004, Rodnina i Wintermeyer 2001, Pape i sur. 1999). Odnosno, vezanje ispravnog supstrata dovodi katalitičke skupine u pravilnu orijentaciju potrebnu za reakciju, dok to nije slučaj za vezanje neispravnog supstrata. Isto tako, ribosom može preferentno stabilizirati komplekse koje sadrže ispravan supstrat u osnovnom i prijelaznom stanju, dok to nije slučaj za neispravne supstrate. Dakle, mehanizam induciranog pristajanja, kroz provjeru ispravnih struktura intermedijera koji se formiraju na reakcijskom putu, omogućava ribosomu povećavanje njegovog selekcijskog potencijala.

6. STRUKTURNI ASPEKTI

Da bi ribosom mogao razlikovati srodne i približno srodne aa-tRNA potrebno je da prepozna strukturne razlike između ispravno i krivno sparenih baza kodona i antikodona. Smatra se da je za to zaslužno nekoliko funkcionalno važnih regija unutar A mjesta koje uključuju: regiju 1400-1500 (zavojnica 44 16S rRNA), posebice dva adenina A1492 i A1493, koji nadgledaju geometriju prva dva para baza kodon-antikodon dvostruke zavojnice; zatim petlju 530 (zavojnica 18) te regiju 1050-1200 (zavojnica 34). Prvi detaljni uvid u dekodirajuće mjesto ribosoma omogućen je nakon rješavanja kristalne strukture 30S podjedinice, kako same tako i u kompleksu s antibioticima koji narušavaju točnost translacije. Navedene strukture riješene su pri rezoluciji od 3 Å zahvaljujući V. Ramakrishnanu i njegovim suradnicima.

Ribosom različito tretira prvu, drugu i treću poziciju kodon-antikodon dvostruke zavojnice. Eksperimentima u kojima se koristio poli-(U) programirani ribosom i tRNA^{Phe} utvrđeno je da najviše kontakata ribosom ostvaruje s drugom pozicijom, zahvaljujući A1492 i G530 koji se nalaze iznad malog utora drugog para baza. Par baza je dodatno stabiliziran

vodikovim vezama, kao i interakcijama s C518 (zavojnica 18) te Ser50 koji se nalazi u sklopu ribosomalnog proteina S12. Unutar kodon-antikodon zavojnice, dolazi do interakcija 2' OH skupine A35 tRNA i odgovarajućeg U unutar kodona. Geometriju prvog para baza nadgleda A1493, koji preko vodikovih veza stupa u interakcije s 2' OH skupinom A36 antikodona te 2' OH skupinom i O2 koji se nalaze unutar uracila u kodonu. Kristalna struktura ribosoma pokazuje da ribosom može razlikovati mali utor kodon-antikodon dvostruke zavojnice, te da razlikuje Watson-Crickove parove od onih pogrešno sparenih. Treća, „kolebljiva“, pozicija kodon-antikodon dvostruke zavojnice nije toliko precizno nadgledana kao prve dvije. 2' OH skupina stvara vodikovu vezu s G530, C518 i S12, dok se riboza antikodona smješta nasuprot C1054 (zavojnica 34). U prisustvu približno srodne tRNA, nije se mogla registrirati gustoća koja bi odgovarala antikodonu, iako se tRNA fragment veže na 30S podjedinicu. Iz toga se može zaključiti da ribosom ne stabilizira ili jako slabo stabilizira približno srodni kodon-antikodon par baza.



Slika 2. Interakcije prve, druge i treće pozicije srodne kodon-antikodon dvostruke zavojnice s elementima 30S podjedinice, 16S rRNA i ribosomalnog proteina S12. (preuzeto iz: Daviter i sur. 2006)

Mutacijske analize otkrile su tri važne regije 23S rRNA na 50S podjedinici koje utječu na točnost translacije: mala stem petlja (SSL) (zavojnica 69) u domeni IV, zavojnica 89 u domeni V te sarcin-ricin petlja (SRL) u domeni VI 23S rRNA. Zavojnica 69 formira most do dekodirajućeg dijela zavojnice 44 16S rRNA. Zavojnica 89 je smještena na rubu peptidil transferaznog centra ribosoma, stoga mutacije u toj regiji mijenjaju strukturu aktivnog centra i

utječu na brzine akomodacije 3' kraja tRNA u A mjesto i/ili formiranje peptidne veze. Mutacije u SRL regiji utječu na interakciju ribosoma s EF-Tu.

Strukturni podaci pokazali su da srodne kodon-antikodon interakcije mijenjaju pozicije adenina unutar dekodirajućeg centra, što rezultira mijenjanjem konformacije 30S podjedinice. U prisustvu približno srodne dvostruke zavojnice, dekodirajući centar ne može zauzeti svoju pravilnu konformaciju. Pravilna konformacija uključuje rotaciju ramenog dijela 30S podjedinice prema njenoj unutrašnjosti i regiji koja sadrži zavojnice 44 i 27. U slučaju pogrešno sparenog para baza unutar kodon-antikodon dvostruke zavojnice, ne dolazi do micanja ramenog dijela. Kinetički podaci pokazali su da je vezanje srodne tRNA u A mjesto snažno stabilizirano te da dolazi do stimulacije GTP-azne aktivnosti EF-Tu. U slučaju vezanja približno srodne tRNA, stabilizacija tog vezanja je slaba, a hidroliza GTP-a jako spora (Gromadski i Rodnina 2004, Pape i sur. 1999). Iz toga bismo mogli zaključiti da postoji povezanost između promjene konformacije dekodirajućeg centra ribosoma, specifične stabilizacije vezanja srodnih tRNA te ubrzavanja narednih reakcija za ispravne supstrate.

Nastanak pravilnog para baza utječe na aktivaciju GTP-azne aktivnosti EF-Tu vezanog na trojni kompleks. Da bi do nje došlo potrebno je da se na prvoj i drugoj poziciji kodon-antikodon dvostruke zavojnice nalaze Watson-Crickovi parovi baza, dok se na trećoj poziciji tolerira postojanje kolebljivog para baza (Gromadski i Rodnina 2004, Pape i sur. 1999). Nepravilno sparen par baza na bilo kojoj poziciji, smanjit će brzinu aktivacije GTP-azne aktivnosti, budući da će se energetska barijera povećati za 2,7-4,5 kcal mol⁻¹. Dvostuke ili trostruko pogrešno sparene baze povećavaju energetska barijeru za 6-7 kcal mol⁻¹ (Gromadski i sur. 2006). Brza aktivacija GTP-azne aktivnosti EF-Tu povezana je s formiranjem interakcija malog utora kodon-antikodon dvostruke zavojnice s A1492 i A1493. Te interakcije vjerojatno imaju veliku ulogu u induciranju konformacijskog signala koji ide od dekodirajućeg centra do funkcionalnih mjesta na 50S podjedinici, te se pomoću njega ubrzava hidroliza GTP-a i akomodacija tRNA.

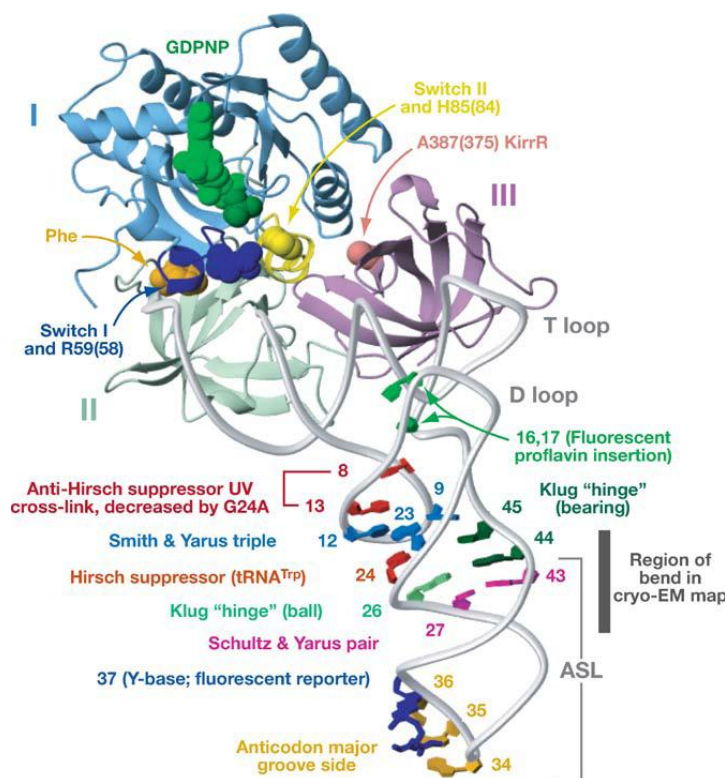
7. ULOGA tRNA

Kao što je već naglašeno, razlikovanje srodnih od približno srodnih aa-tRNA ribosomu omogućuju njihove različite brzine disocijacije kao i ubrzavanje reakcija koje slijede nakon vezanja srodnih aa-tRNA na ribosom. No, u procesu prevođenja genetičkog

koda važna je i sama tRNA. Eksperimenti su pokazali da je za mutiranu tRNA^{Trp}, koja nosi supstituciju u D-ruci, smanjena točnost procesa translacije na način da su reakcije koje se odvijaju na ribosomu poslije prepoznavanja kodon-antikodon dvostruke zavojnice ubrzane, bez obzira na točnost sparivanja baza kodona i antikodona (Cochella i Green 2005). U istraživanju je korišten Hirsh supresor, varijanta tRNA^{Trp} koja prepoznaje triptofanski kodon (UGG) i UGA stop kodon. Ova tRNA nosi G24 supstituciju u D-ruci, pri čemu mijenja par baza U11:G24 u U11:A24. Rezultati su pokazali ubrzanje reakcija s konstantama k_3 i k_4 . Dakle, mutirana tRNA koristi mehanizam induciranog pristajanja kako bi omogućila reakcije hidrolize GTP-a i promjene konformacije EF-Tu te na taj način zaobilazi signalizaciju dekodirajućeg centra. Supstitucija u D-ruci vjerojatno ima direktan učinak na deformiranje tRNA na način da olakšava potrebne konformacijske promjene tijekom prepoznavanja kodona i antikodona.

Krio-elektronska mikroskopija omogućila je uvid u pre-akomodirano stanje tRNA te je utvrđeno da postoji pregib između antikodonske petlje i D-ruke u blizini pozicije G24 tRNA, što dokazuje da su strukturni konformeri tRNA bitni intermedijeri u dekodiranju. Također je moguće da G24 tRNA^{Trp} stvara različite interakcije s obližnjim ribosomalnim elementima kao što su zavojnica 69, SRL te GTP-aza asocirani centar. Svi ti elementi sudjeluju u prijenosu signala tijekom odabira tRNA.

Konformacijske promjene tRNA predstavljaju fizikalnu osnovu za mehanizam induciranog pristajanja, koji doprinosi očuvanju visoke točnosti odabira tRNA (Gromadski i Rodnina 2004).



Slika 3. Struktura trojnog kompleksa EF-Tu, tRNA i GTP analoga (Nissen i sur. 1996). Elementi tRNA i EF-Tu koji su vjerojatno uključeni u kontrolu točnosti translacije ili su korišteni kao reporteri označeni su na strukturi. (preuzeto iz: Ogle i Ramakrishnan 2005)

8. RETROSPEKTIVNA KONTROLA

Predloženo je da postoji još jedan dodatni, retrospektivni mehanizam koji pridonosi očuvanju točnosti tijekom biosinteze proteina, a odvija se nakon formiranja peptidne veze. Navedeni prijedlog temelji se na eksperimentu u kojem je primjećeno da svaki put kad bi Lys-tRNA^{Lys} (antikodon UUU) uspješno prepoznala AAU kodon koji odgovara asparaginu, ne bi došlo do daljnje sinteze polipeptidnog lanca, već do otpuštanja peptidil-tRNA od ribosoma. Ti podaci uputili su na postojanje mehanizma kontrole točnosti koji djeluje nakon formiranja peptidne veze. On efikasno završava translaciju aberantnog proteinskog produkta te na taj način pospješuje ukupnu točnost biosinteze proteina.

Zaključak eksperimenta je bio da ugradnja aminokiseline nesrodne aa-tRNA u rastući polipeptidni lanac dovodi do gubitka specifičnosti A mjesta te do abortivnog završetka sinteze proteina. Ribosom može prepoznati pogreške tijekom sinteze na način da provjerava kodon-antikodon dvostruku zavojnicu u P mjestu, što najprije dovodi do smanjene točnosti tijekom

odabira nadolazećih tRNA i naposljetku prerane terminacije lanca uzrokovane djelovanjem faktora otpuštanja (Zaher i Green 2009).

9. ANTIBIOTICI I MUTACIJE

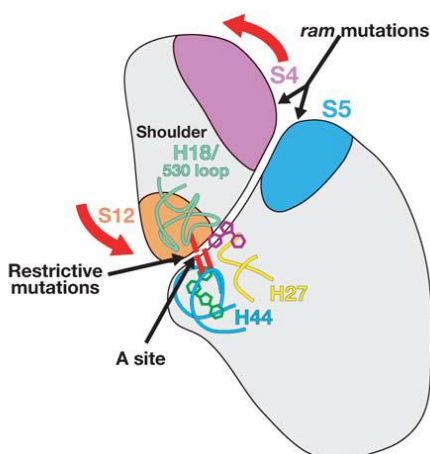
Mehanizmi točnosti translacije počeli su se istraživati upravo zahvaljujući djelovanju nekih antibiotika za koje se pokazalo da se vežu na ribosom i imaju različite utjecaje na točnost translacije. Isto tako, proučavanja kristalne strukture ribosoma u kompleksu s odgovarajućim antibiotikom omogućilo je otkrivanje utjecaja lokalne promjene konformacije u dekodirajućem mjestu na odabir aa-tRNA.

Prvi antibiotik za kojeg je pokazano da djeluje na ribosom bio je aminoglikozid streptomycin (Sm). Ukupni rezultat njegova djelovanja je povećanje učestalosti ugradnje pogrešnih aminokiselina tijekom sinteze proteina. Istrživanja *in vitro* su pokazala da najvjerojatnije utječe i na inicijalni odabir i na kinetičku provjeru. Streptomycin smanjuje brzine aktivacije GTP-aze i akomodacije za srodne aa-tRNA, ali ih zato povećava za one približno srodne (Gromadski i Rodnina 2004). Za potonje zaključke predložena su strukturalna objašnjenja. Struktura 30S podjedinice sa streptomycinom predlaže da on stabilizira njenu zatvorenu konformaciju. To sprječava pomicanje ramena 30S podjedinice u smjeru 50S podjedinice i EF-Tu, što se inače događa u slučaju prepoznavanja srodne kodon-antikodon dvostruke zavojnice. Dakle, streptomycin stvara suboptimalne uvjete za hidrolizu GTP-a. Ona je spora u slučaju vezanja srodne aa-tRNA te je moguće da ju inducira vezanje približno srodne aa-tRNA.

Drugi aminoglikozid korišten u eksperimentima je paromomicin. On se veže unutar dekodirajućeg centra na zavojnicu 44 i utječe na povećanje ugradnje aminokiselina približno srodnih aa-tRNA. Kinetičke analize su pokazale da paromomicin mijenja brzine koraka koji utječu na točnost translacije (Gromadski i Rodnina 2004). On povećava stabilnost vezanja aa-tRNA na A mjesto, brzinu hidrolize GTP-a, koja se u tom slučaju izjednači za srodne i približno srodne supstrate, zatim smanjuje brzinu disocijacije i povećava brzinu nastajanja peptidne veze za približno srodne supstrate. Kristalne strukture su pokazale da u prisustvu paromomicina baze A1492 i A1493 mijenjaju svoj položaj, te se usmjeravaju prema A mjestu. Štoviše, kada je paromomicin dodan kompleksu 30S podjedinice i antikodonske stem petlje (ASL) približno srodne tRNA, primjećeno je da se struktura dekodirajućeg centra stabilizira,

te je gustoća kristalne strukture i ASL-a i kodona vidljiva. Iznenadujuće, ukupna konformacija približno srodne ASL u prisustvu paromomicina bila je gotovo identična onoj konformaciji srodne ASL. Interakcije A1492, A1493 i G530 s malim utorom kodon-antikodon dvostruke zavojnice bile su jako slične onima u slučaju vezanja srodnog supstrata, te je pronađeno karakteristično zatvaranje 30S podjedinice.

Kristalne strukture pokazuju da su mutacije koje djeluju na 30S podjedinicu, a utječu na prepoznavanje kodona i antikodona raspoređene preko njene cijele regije. Dvije posebne klase mutacija su *ram* mutanti koji smanjuju točnost i *str* mutacije koje daju rezistentnost na streptomycin i povećavaju točnost. Kod većine *ram* mutacija dolazi do narušavanja strukture podjedinice između proteina S4 i S5, važne u stvaranju mostova prilikom njenog zatvaranja. Narušavanje te strukture doprinosi energetsom utrošku zatvaranja domene. Dolazi do smanjenja energetske barijere tako da i približno srodne aa-tRNA mogu inducirati zatvaranje domene što na kraju dovodi do procesiranja takve aa-tRNA te smanjenja točnosti. Restriktivni mutanti imaju suprotan učinak. Strukture su pokazale da su između S12 i rRNA uspostavljeni dodatni kontakti u zatvorenoj konformaciji, koji dovode do njene stabilizacije. Mutacije koje narušavaju te dodatne interakcije rezultiraju destabilizacijom zatvorene konformacije i na taj način povećavaju energetska barijeru za njeno formiranje. To dovodi do povećanja točnosti i smanjenja brzine. Ove mutacije koje daju bakteriji otpornost na streptomycin, umanjuju učinak streptomicina, ali ne sprječavaju njegovo vezanje.



Slika 4. Presjek kroz 30S podjedinicu. Shematski prikaz odnosa zatvaranja domene (pomicanje ramena) i elemenata unutar 30S podjedinice koji utječu na točnost translacije. (preuzeto iz: Ogle i sur. 2003)

10. IONSKI UVJETI

Već od samih početaka istraživanja translacije poznato je da magnezijevi ioni kao i poliamini utječu na učinkovitost prijenosa genetičke informacije. Učinak magnezija u prisustvu i bez prisustva poliamina je povećavanje učestalosti pogreški. Magnezij djeluje na svaki korak vezanja u A mjesto i srodnih i približno srodnih aa-tRNA (Gromadski i sur. 2006). Konstante brzine vezanja i disocijacije trojnog kompleksa k_1 , k_{-1} , k_2 , i k_{-2} se smanjuju s povećanjem $[Mg^{2+}]$, dok se brzine aktivacija GTP-aze i k_3 povećavaju i za srodne i za približno srodne aa-tRNA. Strukturno gledajući, vezanje magnezija može promijeniti konformaciju RNA i stabilizirati njenu tercijarnu strukturu, te na taj način utjecati na njenu sposobnost da podlegne konformacijskim promjenama. Stabiliziranjem određene konformacije rRNA i tRNA, magnezijevi ioni ograničavaju pokretanje bitnih strukturnih elemenata na ribosomu koji su bitni za pozicioniranje antikodona u aktivnom mjestu. To objašnjava slabo prepoznavanje kodona pri visokim $[Mg^{2+}]$.

Poliamini su kationi koji mogu neutralizirati negativne naboje i vjeruje se da pridonose točnosti translacije. No, utjecaji poliamina u dva *in vivo* eksperimenta su se pokazali različitima, tako da je njihova uloga u odabiru aa-tRNA još uvijek nejasna. Utjecaj poliamina na učinkovitost provjere *in vitro* je umjerena i ovisna o koncentraciji magnezijevih iona. Pri $[Mg^{2+}]$ od 10 mM, poliamini smanjuju učestalost pogreški, dok ju pri $[Mg^{2+}]$ od 20 mM povećavaju. Pri $[Mg^{2+}]$ od 5mM poliamini povećavaju učestalost pogreške oko 2 puta. To ukazuje da je njihov mehanizam djelovanja različit od onoga magnezijevih iona. Oni mogu zauzeti neka, ali ne i sva vezna mjesta za magnezij. Uloga magnezija i poliamina može se objasniti time da stabiliziraju tercijarnu strukturu aa-tRNA, koja igra važnu ulogu u prenošenju signala od dekodirajućeg mjesta na 30S podjedinici do funkcionalnih mjesta na 50S podjedinici te tako pokazuju koliko je konformacija tRNA bitna u reguliranju brzine i točnosti dekodiranja.

11. LITERATURA

- Blanchard SC, Gonzalez RL, Kim HD, Chu S, Puglisi JD. 2004. tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:1008-14.
- Cochella L, Green R. 2005. An active role for tRNA in decoding beyond codon: anticodon pairing. *Science* 308:1178–1180.
- Cochella L, Green R. 2005. Fidelity in protein synthesis. *Curr. Biol.* 15:536-40.
- Daviter T, Gromadski KB, Rodnina MV. 2006. The ribosome's response to codon-anticodon mismatches. *Biochimie.* 88:1001-11.
- Green R, Noller H. 1997. Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 1997. 66:679–716
- Gromadski KB, Daviter T, Rodnina MV. 2006. A uniform response to mismatches in codon–anticodon complexes ensures ribosomal fidelity. *Mol. Cell.* 21:369–377.
- Gromadski KB, Rodnina MV. 2004. Kinetic determinants of high-fidelity tRNA discrimination on the ribosome. *Mol. Cell* 13:191–200.
- Hopfield J.J. 1974. Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 71:4135-9.
- Ibba M, Söll D. 1999. Quality control mechanisms during translation. *Science* 286:1893-7
- Lehninger, A. L. 1970. Biochemistry (Worth Publishers, Inc., New York).
- Ogle JM, Ramakrishnan V. 2005. Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem.* 74:129-77.
- Pape T, Wintermeyer W, Rodnina MV. 1998. Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *EMBO J.* 17:7490–97
- Pape T, Wintermeyer W, Rodnina MV. 1999. Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.* 18:3800–7.
- Ramakrishnan V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108:557-72.
- Rodnina MV, Daviter T, Gromadski K, Wintermeyer W. 2002. Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie* 84: 745–54
- Rodnina MV, Gromadski KB, Kothe U, Wieden HJ. 2005. Recognition and selection of tRNA in translation. *FEBS Lett.* 579: 938-42.
- Rodnina MV, Pape T, Fricke R, Kuhn L, Wintermeyer W. 1996. Initial binding of the elongation factor Tu·GTP·aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *J. Biol. Chem.* 271:646–652.

Rodnina MV, Wintermeyer W. 2001. Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 70:415-35.

Rodnina MV, Wintermeyer W. 2001. Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends Biochem. Sci.* 26:124-30.

Thompson RC, Karim AM. 1982. The accuracy of protein biosynthesis is limited by its speed: high fidelity selection by ribosomes of aminoacyl-tRNA ternary complexes containing GTP[gamma S]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 79:4922-6.

Thompson RC, Stone PJ. 1977. Proofreading of the codon-anticodon interaction on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:198-202.

Zaher HS, Green R. 2009. Quality control by the ribosome following peptide bond formation. *Nature* 457:161-6.

12. SAŽETAK

Da bi život bio moguć potreban je stalan protok genetičke informacije. Sintezu proteina na temelju informacije pohranjene u DNA omogućuju replikacija i transkripcija DNA te translacija mRNA. Točnost i brzina tih procesa bitni su za održavanje funkcionalnosti nekog organizma. Prilikom translacije može doći do ugradnje pogrešnih aminokiselina u polipeptidni lanac. No, postoji niz mehanizama na ribosomu koji omogućuju da učestalost ugradnje pogrešnih aminokiselina ne prelazi 1×10^{-3} . Ovisno o sparivanju kodona mRNA i antikodona tRNA razlikujemo srodne, približno srodne i nesrodne aminoacilirane tRNA (aa-tRNA). Srodne aa-tRNA su one čije su baze antikodona potpuno komplementarne bazama kodona mRNA. Na ribosom aa-tRNA dolaze u obliku trojnog kompleksa s elongacijskim faktorom Tu (EF-Tu) i GTP-om. Ribosom odabire srodne aa-tRNA zahvaljujući mehanizmima kinetičke provjere i induciranog pristajanja. Ispravno sparene baze kodona i antikodona pokreću mehanizam induciranog pristajanja, koji dovodi do pravilne orijentacije aktivnih mjesta na ribosomu potrebnih za reakcije hidrolize GTP-a i akomodacije aa-tRNA u A mjestu. Konformacijske promjene odvijaju se u dekodirajućem centru male podjedinice ribosoma te se konformacijski signal prenosi do velike podjedinice koja je uključena u hidrolizu GTP-a i akomodaciju. Pokazano je da je komunikacija između male i velike podjedinice moguća zbog stvaranja ionskih mostova, koji nastaju nakon zatvaranja male podjedinice uslijed vezanja srodnog supstrata. Zahvaljujući GTP-aznoj aktivnosti EF-Tu, proces odabira srodne aa-tRNA rastavljen je na dva koraka: inicijalni odabir i kinetičku provjeru. Oni omogućuju ribosomu da u više navrata odbaci približno srodnu i nesrodnu aa-tRNA te na taj način višestruko povećavaju točnost translacijskog procesa.

13. SUMMARY

Constant flow of genetic information makes life possible. Protein biosynthesis based on information stored in DNA molecule is enabled by replication and transcription of DNA and translation of mRNA. Accuracy and speed of those processes are crucial for maintaining organism functionality. During translation, incorrect amino acids can be incorporated in a polypeptide chain. There are several mechanisms on the ribosome which prevent that incorporation frequency of incorrect amino acids rises above 1×10^{-3} . Based on mRNA codon and tRNA anticodon pairing we can distinguish three types of aminoacylated tRNAs (aa-tRNA): cognate, near-cognate and non-cognate. Anticodon of cognate aa-tRNA is completely complementary with the codon of mRNA. Aa-tRNA is bound to the ribosome in the form of ternary complex together with the elongation factor Tu (EF-Tu) and GTP. Ribosome selects cognate aa-tRNA via mechanisms of kinetic proofreading and induced fit. Complementarity between codon and anticodon induces a conformational change that changes the orientation of active sites on the ribosome, required for reactions of GTP hydrolysis and accomodation of aa-tRNA in A site. Those conformational changes occur in the decoding center of small ribosomal subunit and conformational signal is transmitted to the large subunit which is involved in GTP hydrolysis and accomodation. It has been shown that communication between small and large ribosomal subunit is possible because of formation of intersubunit bridges. They are formed after small subunit closure, caused by cognate supstrate binding. Because of the GTPase activity of EF-Tu, process of cognate aa-tRNA selection has been separated in two stages: initial selection and kinetic proofreading. They enable ribosome to reject near-cognate and non-cognate aa-tRNA several times, and in that way they increase the accuracy of protein biosynthesis on the ribosome.